

BEST AVAILABLE COPY

MODULARIO  
LCA - 101

TM/EF U 37 U 41 U U

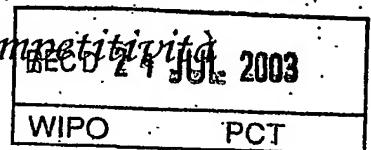


Mod. C.E. - 14-7

04.07.2003

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività  
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi  
Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

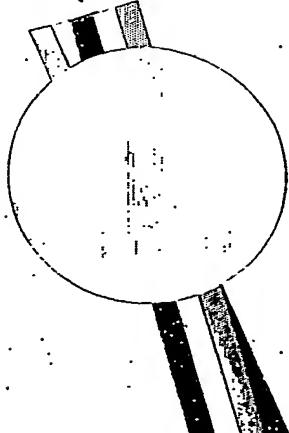
N. MI2002 A 000872



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accusato processo verbale di deposito.

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il ..... 9 MAG. 2003



IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotti  
Giampietro Carlotti

## AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

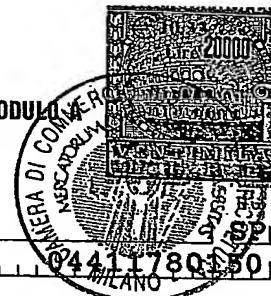
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INDENA S.p.A.Residenza Milano

MODUL



codice

04411780150

MILANO

SP

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

2000

## 2) Denominazione

Residenza

codice

codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.via Rossinin. 8città Milanocap 20122 (prov) MI

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.   

città

cap    (prov)   

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl)

gruppo/sottogruppo

"Derivati dell'iperforina, loro uso e formulazioni che li contengono"ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI  NO 

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

SE Istanza: DATA

Nº PROTOCOLLO

1) Bombardelli Ezio

cognome nome

3) Riva Antonella2) Morazzoni Paolo4) Fuzzati Nicola

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/RSCIOLGIMENTO RISERVE  
Data Nº Protocollo1)         2)         

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12  PROV n. pag. 17

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....

Doc. 2) 10  PROV n. tav.   

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) ....

Doc. 3) 1  RIS

lettera d'incarico, preura e riferimento procura generale ....

Doc. 4) 10  RIS

designazione Inventore ....

Doc. 5) 10  RIS

documenti di priorità con traduzione in Italiano ....

Doc. 6) 10  RIS

autorizzazione o atto di cessione ....

Doc. 7) 10

nominativo completo del richiedente ....

SCIOLGIMENTO RISERVE  
Data Nº Protocollo

|           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |

confronta singole priorità

|           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |
| <u>  </u> | <u>  </u> | <u>  </u> |

8) attestati di versamento, totale Euro

Centottantotto/51#

obbligatorio

COMPILATO IL 23/04/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Bianchetti GiuseppeCONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI BICHIODE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO

MILANO

codice 1815VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MT2002A 000872

Reg. A

L'anno DUEMILADUE

IND. 18 VENTITRE

Il(I) richiedente(I) sopraindicato(I) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di deposito, di cui alla data di 23/04/2002, per la concessione di un brevetto di invenzione industriale.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE  
P. Bonelli

IND. 18 VENTITRE

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

23/04/2002

MILANO

L'UFFICIALE ROGANTE  
97

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 000872

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

23/04/2002

DATA DI RILASCI

11/11/2002

D. TITOLO

"Derivati dell'iperforina, loro uso e formulazioni che li contengono"

L. RIASSUNTO

Si descrive l'uso di prodotti di riduzione dell'iperforina e dell'adiperforina, dei loro sali o esteri farmaceuticamente accettabili in campo farmaceutico e/o nutrizionale nel trattamento degli stati di depressione, di ansia e del morbo di Alzheimer.

M. DISEGNO



6789 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

MV/mgg **"DERIVATI DELL'IPERFORINA, LORO USO E FORMULAZIONI  
CHE LI CONTENGONO"**

a nome : **INDENA S.p.A.**

con sede in : **Milano**



\* \* \*

**CAMPO DELL'INVENZIONE**

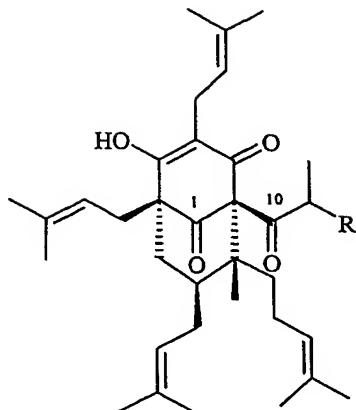
**MI 2002 A 0 0 0 8 7 2**

La presente invenzione riguarda derivati dell'iperforina e dell'adiperforina e il loro uso in campo farmaceutico e/o nutrizionale, in particolare nel trattamento degli stati di depressione, di ansia e del morbo di Alzheimer.

**STATO DELLA TECNICA**

Le sommità fiorite di *Hypericum perforatum* contengono numerose classi di sostanze strutturalmente diverse, tutte dotate direttamente o indirettamente di attività a livello del sistema nervoso centrale. I meccanismi d'azione di questi composti sono differenti e comprendono un'azione anti-MAO (Suzuki O. et al. *Planta Med.*, 272-4, 1984), un'azione sul rilascio e sul re-uptake della serotonina (Muller W.E. et al. *Pharmacopsychiatry*, 30, 102-107, 1997) ed un'attività benzodiazepino-simile (Coot J.M. *Pharmacopsychiatry* 30,108-112, 1997).

L'iperforina, un derivato della floroglucina, è uno dei maggiori costituenti della frazione lipofila delle sommità fiorite di *Hypericum perforatum*; tale frazione, anche se in concentrazione minore, contiene anche adiperforina, omologo superiore dell'iperforina (Erdelmeier C.A.J., *Pharmacopsychiatry*, 31, 2-6, 1998).

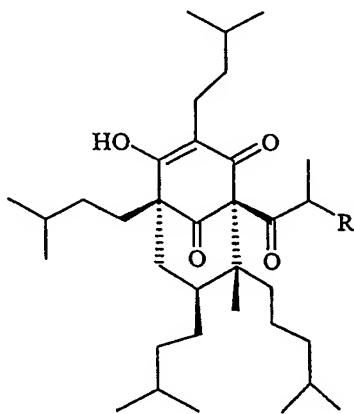


iperforina:  $R = \text{CH}_3$   
 adiperforina:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$

L'iperforina è stata recentemente oggetto di numerosi studi attraverso i quali è stato possibile stabilire il suo importante ruolo antidepressivo (Pharmacopsychiatry, 31 Suppl.1, 1-60, 1998). È noto inoltre che gli estratti di *Hypericum perforatum* possono essere utilizzati per la profilassi ed il trattamento di malattie neurodegenerative, fra le quali il morbo di Alzheimer (WO/9940905, WO0057707). In particolare, sono stati descritti a questo scopo (WO9941220) sali dell'iperforina e dell'adiperforina con cationi inorganici o con sali d'ammonio.

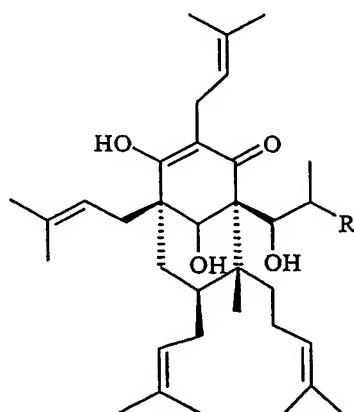
E' noto dalla letteratura che l'iperforina, in condizioni normali di estrazione e conservazione, è poco stabile; secondo WO 97/13489 il contenuto di iperforina in un estratto idroalcolico di iperico si riduce drasticamente già dopo poche settimane. Sempre secondo WO 97/13489, per ottenere estratti stabili di iperforina, occorre la presenza di antiossidanti in tutte le fasi di lavorazione (estrazione, purificazione e conservazione). Se ne deduce quindi che l'alto grado di instabilità dell'iperforina la rende poco maneggevole per la preparazione di composizioni farmaceutiche. Per ovviare a tale inconveniente, recentemente sono stati preparati composti più stabili dell'iperforina, tra cui i sopracitati sali descritti in WO 99/41220 e derivati funzionalizzati sull'ossidrile (WO 99/64388).

È noto inoltre (Bystrov et al., Bioorg. Khim, 1978) che iperforina ed adipiperforina possono essere trasformate nei corrispondenti ottaidroderivati, ottaidroiperforina (**Ia**) e ottaidroadiperforina (**Ib**), per riduzione catalitica delle catene isopreniche laterali



(Ia: R = CH<sub>3</sub>  
Ib: R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

o nei corrispondenti tetraidroderivati, tetraidroiperforina (**Ic**) e tetraidroadiperforina (**Id**), per riduzione con idruri metallici dei gruppi chetonici in posizione 1 e 10 a gruppi idrossilici.



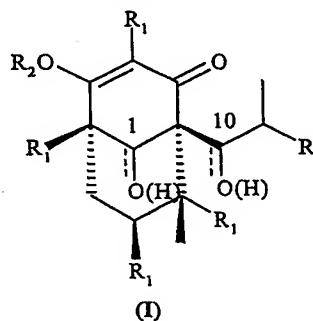
(Ic: R = CH<sub>3</sub>,  
Id: R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

## DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che derivati dell'iperforina e dell'adiperforina ottenibili

per riduzione di tutti i doppi legami delle catene isopreniche e/o per riduzione delle funzioni chetoniche in posizione 1 e 10 a gruppi idrossilici non solo sono dotati di elevata stabilità, ma possiedono anche attività antidepressiva, ansiolitica ed anti-neurodegenerativa sorprendentemente superiori a quella dell'iperforina e dell'adiperforina.

Oggetto della presente invenzione è pertanto l'uso di derivati dell'iperforina e dell'adiperforina di formula (I)



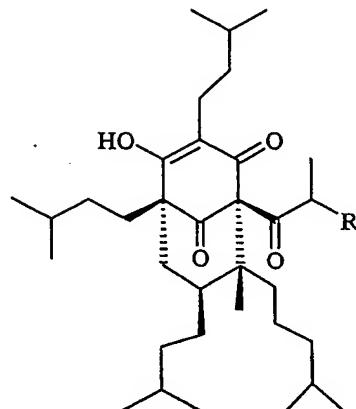
in cui R rappresenta metile o etile, R2 rappresenta idrogeno, un catione di base inorganica o organica farmaceuticamente accettabili o un residuo acilico C2-C5, lineare o ramificato e in cui, alternativamente:

- a) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso;
- b) R1 rappresenta 3-metil-2-buten-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi;
- c) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi

per la preparazione di medicamenti, in particolare per la preparazione di farmaci per la terapia della depressione e per la terapia del morbo di Alzheimer.

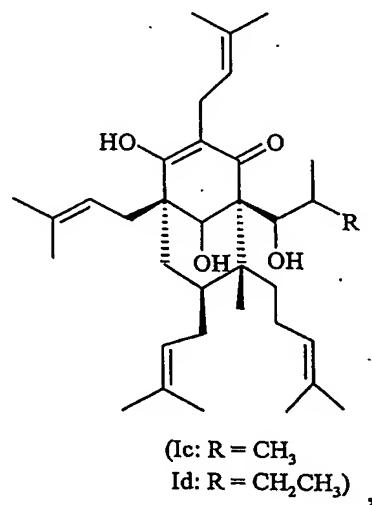
Fra i composti di formula (I) come definiti al punto a) è preferito l'uso

di quelli in cui R2 è idrogeno, d'ora in poi definiti ottaidroiperforina (**Ia**) e ottaidroadiperforina (**Ib**)



(Ia: R = CH<sub>3</sub>  
Ib: R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

Fra i composti di formula (I) come definiti al punto b) è preferito l'uso di quelli in cui R2 è idrogeno (d'ora in poi definiti tetraidroiperforina **Ic** e tetraidroadiperforina **Id**)

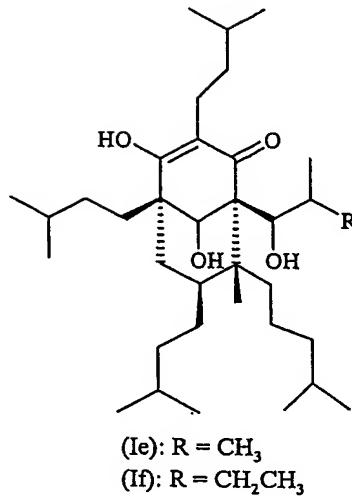


(Ic: R = CH<sub>3</sub>  
Id: R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

ancor più preferito è l'uso di tetraidroiperforina (**Ic**).

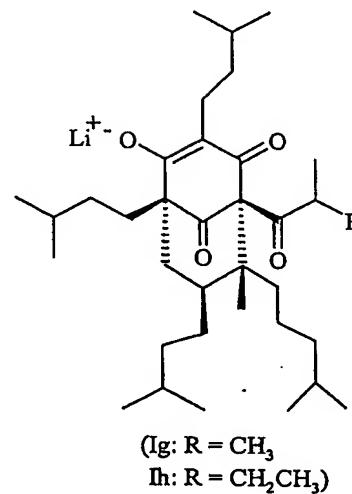
Fra i composti di formula (I) come definiti al punto c) è preferito l'uso di quelli in cui R2 è idrogeno (d'ora in poi definiti dodecaidroiperforina **Ie** e dodecaidroadiperforina **If**). 

---



ancor più preferito è l'uso di dodecaidroiperforina (Ie).

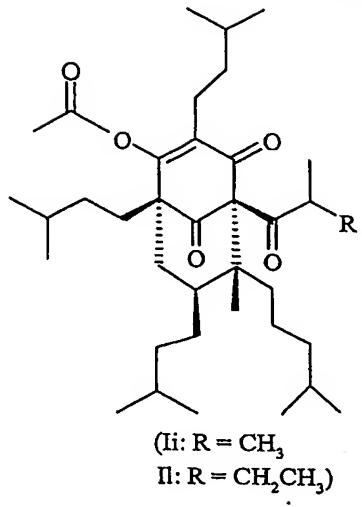
Inoltre, fra i composti di formula (I) come definiti al punto a) è preferito l'uso di quelli in cui R<sub>2</sub> rappresenta litio (ottaaidroiperforina sale di litio Ig e ottaidroadiperforina sale di litio Ih)



ancor più preferito è l'uso di ottaidroiperforina sale di litio (Ig);

e di quelli in cui R rappresenta acetile (acetilottaaidroiperforina II e acetilottaidroadiperforina II) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



in particolare di acetilottaaidroiperforina (Ii).

Dodecaidroiperforina (Ie), dodecaidroadiperforina (If), acetilottaaidroiperforina (Ii) e acetilottaaidroadiperforina (II) sono composti nuovi e sono anch'essi parte della presente invenzione. sono composti nuovi e sono anch'essi parte della presente invenzione.

I composti di formula (Ia) e (Ib) vengono ottenuti per riduzione delle catene isopreniche laterali mediante idrogenazione catalitica, utilizzando ad esempio carbone palladiato o Nichel/Raney.

I composti di formula (Ic) e (Id) vengono ottenuti per riduzione dei gruppi chetonici in posizione 1 e 10 con idruri, scelti ad esempio fra  $\text{NaBH}_4$ , Redal<sup>®</sup>, Vitride<sup>®</sup>,  $\text{LiAlH}_4$ .

I composti di formula (Ie) e (If) vengono ottenuti riducendo dapprima le catene isopreniche laterali e poi i gruppi chetonici in posizione 1 e 10 secondo quanto precedentemente descritto.

I prodotti di formula (I) in cui R2 rappresenta un catione di base inorganica o organica o un residuo acilico possono essere preparati dai prodotti di formula (I) in cui R2 rappresenta idrogeno per salificazione o

esterificazione con metodi convenzionali.

Il procedimento per ottenere i composti dell'invenzione a partire dalle sommità fiorite di *Hypericum perforatum* può così essere riassunto:

Le sommità fiorite di *Hypericum perforatum* possono essere estratte con alcoli o chetoni alifatici puri o loro miscele con acqua o gas in condizioni supercritiche; l'estratto comunque ottenuto si ripartisce fra n-esano e miscele idroalcoliche con alcoli alifatici miscibili con acqua. Si controestrae la soluzione esanica con metanolo alcalino per estrarre iperforina ed adipiperforina. Dopo acidificazione si tratta la soluzione metanolica con una resina a scambio ionico debolmente basica, che trattiene selettivamente iperforina ed adipiperforina. La resina viene eluita con metanolo acido e l'eluato, dopo concentrazione a piccolo volume, viene diluito con acqua e controestratto con n-esano. Si concentra la soluzione esanica a piccolo volume ed il concentrato è pronto per la derivatizzazione. Si riprende questo residuo in solventi clorurati e si addiziona del reattivo opportuno secondo le modalità riportate negli esempi.

I composti dell'invenzione hanno mostrato effetto antidepressivo, che è stato valutato nel ratto mediante il forced swimming test, valutando i parametri struggling, floating e swimming secondo quanto descritto da Cervo et al. in *Neuropharmacology*, 26, 14969-72, 1987. I prodotti sono stati somministrati in 3 dosi: 30 minuti dopo il pre-test, 5 ore e 30 minuti prima del test. I risultati riportati nella tabella sottostante dimostrano che i composti oggetto dell'invenzione risultano più attivi dell'iperforina da cui derivano.



| Trattamento                      | mg/Kg | Struggling<br>(sec.) | Floating<br>(sec.) | Swimming<br>(sec.) |
|----------------------------------|-------|----------------------|--------------------|--------------------|
| Veicolo                          |       | 7.0 ± 2.4            | 174.5 ± 15.9       | 118.5 ± 15.8       |
| Ottaidroiperforina sale di litio | 6.25  | 63.1 ± 5.8           | 59.5 ± 11.3        | 177.4 ± 14.9       |
| Tetraidroiperforina              | 6.25  | 51.4 ± 4.1           | 68.4 ± 7.6         | 193.4 ± 13.2       |
| Dodecaidroiperforina             | 6.25  | 62.13 ± 5.1          | 55.1 ± 6.2         | 169.5 ± 10.1       |
| Acetilottaidroiperforina         | 6.25  | 73.9 ± 5.9           | 68.4 ± 5.7         | 171.9 ± 11.4       |
| Iperforina                       | 6.25  | 30.4 ± 4.6           | 60.4 ± 7.3         | 99.3 ± 10.6        |
| Desimipramina                    | 10    | 148.3 ± 12.6         | 53.0 ± 9.2         | 98.8 ± 7.9         |

I composti dell'invenzione si sono inoltre dimostrati particolarmente attivi contro il morbo di Alzheimer, grazie alla loro capacità di aumentare l'APPs, forma solubile e non dannosa dell'Alzheimer Precursor Protein (APP). E' noto infatti che la scissione proteolitica dell'Alzheimer Precursor Protein (APP) è mediata sia dalla  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi, dando luogo ad un'aumentata produzione di peptide amiloide A $\beta$ 1-42 (che ha un ruolo centrale nel manifestarsi della malattia di Alzheimer), che dalla  $\alpha$ -secretasi, dando luogo all'APPs solubile privo di attività patogena (Eslr W.P., Wolfe M.S., Science, 293,1449-54, 2001).

L'effetto dei composti dell'invenzione sulla liberazione di APPs prodotto dalla  $\alpha$ -secretasi è stato determinato nel mezzo di cultura di una linea cellulare di neuroblastoma (SH-SY5Y) secondo quanto riportato da Galbete J.L. et al. in Biochem J. 348,307-313,2000.

I risultati riportati nella seguente tabella indicano che i prodotti saggianti

attivano il metabolismo dell'APP mediato dalla  $\alpha$ -secretasi, inducendo un aumento di APPs secreto nel mezzo di cultura:

|   | APPs % |
|---|--------|
| Controlli                                   | 100    |
| Iperforina 10 $\mu$ M                       | 296    |
| Ottaidroiperforina sale di Litio 10 $\mu$ M | 1383   |
| Tetraidroiperforina 10 $\mu$ M              | 926    |
| Dodecaidroiperforina 10 $\mu$ M             | 879    |
| Acetilottaidroiperforina 10 $\mu$ M         | 954    |

I composti dell'invenzione possono essere formulati, secondo tecniche convenzionali, ad esempio secondo quanto descritto in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed. Mack Pub., N.Y., U.S.A, in capsule di gelatina molle, capsule di gelatina dura, compresse, supposte; preferenzialmente l'estratto dell'invenzione viene formulato in capsule di gelatina molle o in formulazioni a rilascio controllato. Il dosaggio è compreso fra 10 e 100 mg pro dose nelle formulazioni normali e fino a 200 mg nelle formulazioni a rilascio controllato, essendo in questo caso la dose consigliata di 200 mg pro dose/pro die. I prodotti possono essere inoltre somministrati per via transdermica a rilascio controllato applicando il formulato in zona prossimale alle derivazioni arteriose carotidee cerebrali. I dosaggi di composto in queste formulazioni vanno da 10 a 100 mg pro dose/pro die.

Gli esempi più sotto riportati illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

## ESEMPI

### Esempio 1 - Preparazione di ottaidroiperforina sale di dicloesilammonio

50 g di iperforina ottenuta secondo quanto riportato nell'esempio 1

vengono sciolti in 500 ml di acetato d'etile in presenza di 2 g di carbone palladiato al 5% e idrogenati fino a completo assorbimento di idrogeno. Dopo filtrazione del catalizzatore la soluzione etero-acetica viene concentrata a secco nel vuoto ed il residuo viene sciolto in n-esano. Alla soluzione viene aggiunta una quantità stochiometrica di dicicloesilammina, che permette una cristallizzazione sufficientemente selettiva del sale corrispondente.

Si ottengono 62 g del sale di dicicloesilammonio di ottaidroiperforina avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.03 (2H, m, CH-DCHA), 2.55-2.30, 2.10-1.76 (20H, m,  $\text{CH}_2$ -DCHA), 1.70-1.10 (22H, m, H-4, H-11,  $\text{CH}_2$ -5,  $\text{CH}_2$ -15,  $\text{CH}_2$ -16,  $\text{CH}_2$ -17,  $\text{CH}_2$ -21,  $\text{CH}_2$ -22,  $\text{CH}_2$ -26,  $\text{CH}_2$ -27,  $\text{CH}_2$ -31,  $\text{CH}_2$ -32), 0.97-0.83 (24H, d,  $\text{CH}_3$ -19,  $\text{CH}_3$ -20,  $\text{CH}_3$ -24,  $\text{CH}_3$ -25,  $\text{CH}_3$ -29,  $\text{CH}_3$ -30,  $\text{CH}_3$ -34,  $\text{CH}_3$ -35), 1.19, 1.12 (6H, d,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -12,  $\text{CH}_3$ -13), 0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -14).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  213.1, 211.1, 186.3, 183.6, 119.0, 82.5, 60.8, 53.5, 47.5, 44.2, 41.3, 41.0, 40.9, 38.2, 38.1, 37.8, 33.8, 31.0, 30.7, 30.0, 29.4, 28.8, 28.3, 27.9, 27.1, 25.4, 25.1, 24.9, 23.5, 23.2, 23.1, 22.9, 22.8, 22.7, 22.5, 13.7. ESIMS  $m/z$  567 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] (100), 1111 [ $2\text{M}+\text{Na}^+$ ] (91).

### Esempio 2 - Preparazione di tetraidroiperforina

2 g di iperforina (P.M. = 536,01) sono solubilizzati, sotto agitazione magnetica, in 20 ml di THF; alla soluzione si aggiunge  $\text{LiAlH}_4$  in forte eccesso (1 g, 0,026 mol, P.M. = 38). Il decorso della reazione è seguito per TLC (eluente etere di petrolio/EtOAc 9:1  $R_{\text{fp}}=0,6$ ;  $R_{\text{fa}}=0,39$ ;  $R_{\text{fb}}=0,32$ ;  $R_{\text{fc}}=0,22$ ;  $R_{\text{fd}}=0,125$ ). Dopo dieci minuti la reazione è ultimata.

Per distruggere l'eccesso di reattivo si aggiunge  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  supportato su celite (3:1 in peso): la reazione sviluppa molto calore, pertanto è

opportuno raffreddarla con ghiaccio. Il calore sviluppato fa evaporare parte del solvente. Si filtra su celite e il filtrato viene lavato tre volte con 20 ml di EtOAc. La soluzione viene trasferita in un pallone a un collo da 150 ml e il solvente viene completamente evaporato.

Il prodotto ottenuto viene purificato per cromatografia su colonna.

Si utilizza una colonna da 200 ml impaccata con 100 ml di gel di silice e una miscela eluente etere di petrolio/EtOAc 95:5. Si raccolgono frazioni di eluato da circa 20 ml e si controlla il contenuto in TLC (etero di petrolio/EtOAc 9:1).

Dopo cristallizzazione da metanolo si ottengono 1.5 g del composto desiderato.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.11 (1H, m, H-22), 5.00 (3H, m, H-17, H-27, H-32), 3.11 (1H, dd,  $J$  = 14.0, 7.4 Hz,  $\text{CH}_2$ -26), 2.92 (1H, dd,  $J$  = 14.0, 7.0 Hz,  $\text{CH}_2$ -26), 2.50-1.35 (12H, m, H-4, H-11,  $\text{CH}_2$ -5,  $\text{CH}_2$ -15,  $\text{CH}_2$ -16,  $\text{CH}_2$ -21,  $\text{CH}_2$ -31), 1.80-1.52 (24H, s,  $\text{CH}_3$ -19,  $\text{CH}_3$ -20,  $\text{CH}_3$ -24,  $\text{CH}_3$ -25,  $\text{CH}_3$ -29,  $\text{CH}_3$ -30,  $\text{CH}_3$ -34,  $\text{CH}_3$ -35), 1.19-0.95 (9H, d,  $\text{CH}_3$ -12,  $\text{CH}_3$ -13,  $\text{CH}_3$ -14).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  200.5, 174.3, 134.1, 132.6, 131.2, 130.6, 125.8, 123.9, 122.6, 120.5, 119.4, 79.2, 73.1, 39.6, 37.2, 30.5, 32.8, 31.3, 30.2, 26.1, 26.0, 25.8, 23.5, 23.1, 21.9, 20.0, 18.3, 18.1, 17.8, 15.6.

ESIMS  $m/z$  1103 [2M+Na<sup>+</sup>] (100), 541 [M+H<sup>+</sup>] (25), 563 [M+Na<sup>+</sup>] (12).

### Esempio 3 - Preparazione di ottaidroiperforina sale di litio

15 g di ottaidroiperforina sale di dicicloesilammonio vengono eluiti su una resina acida (Dowex 50X8, 300 g.) con 600 ml di metanolo. Si ottengono 11.01 g di ottaidroiperforina ai quali si aggiungono 0.8745 g di LiOH monoidrato sciolto in acqua. Si evapora a secco ottenendo 11.41 g di sale di litio avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 1.93-1.00 (22H, m, H-4, H-11, CH<sub>2</sub>-5, CH<sub>2</sub>-15, CH<sub>2</sub>-16, CH<sub>2</sub>-17, CH<sub>2</sub>-21, CH<sub>2</sub>-22, CH<sub>2</sub>-26, CH<sub>2</sub>-27, CH<sub>2</sub>-31, CH<sub>2</sub>-32), 1.00-0.80 (24H, d, CH<sub>3</sub>-19, CH<sub>3</sub>-20, CH<sub>3</sub>-24, CH<sub>3</sub>-25, CH<sub>3</sub>-29, CH<sub>3</sub>-30, CH<sub>3</sub>-34, CH<sub>3</sub>-35), 1.20, 1.06 (6H, d, J = 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>-12, CH<sub>3</sub>-13), 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 211.4, 191.3, 184.6, 82.7, 61.5, 51.3, 47.7, 41.5, 40.5, 38.2, 37.9, 37.7, 33.9, 30.5, 29.6, 28.7, 28.3, 28.1, 27.1, 23.3, 23.1, 23.0, 22.8, 22.7, 22.4, 22.0, 14.0.

ESIMS *m/z* 551 [M+H<sup>+</sup>] (100), 557 [M+Li<sup>+</sup>] (40), 1102 [2M+H<sup>+</sup>] (71), 1108 [M+Li<sup>+</sup>] (75).

**Esempio 4 - Preparazione di dodecaidroiperforina.**

1,72 g di diciclosilammonio ottaidroiperforinato (P.M. = 716; 2,41 mmol) vengono sciolti, sotto agitazione magnetica, in 20 ml di THF; alla soluzione si aggiunge un forte eccesso (3,5 g) di LiAlH<sub>4</sub> (P.M.= 38; 0,092 mol). Il decorso della reazione viene seguito in TLC (eluente etere di petrolio/EtOAc 9:1 R<sub>fp</sub>=0,6; R<sub>fa</sub>=0,6; R<sub>fc</sub>=0,52; R<sub>fd</sub>=0,18). Dopo dieci minuti la reazione è ultimata.

Si distrugge l'eccesso di reattivo secondo quanto descritto nell'esempio 4. Si filtra la miscela di reazione semisolida lavando accuratamente il residuo con acetato d'etile. La soluzione viene evaporata a secco, il grezzo di reazione viene sciolto in 15 ml di etere di petrolio/etere etilico 3:1 e la soluzione viene trasferita in imbuto separatore da 150 ml. La fase organica viene lavata tre volte con acido solforico 2N e successivamente con acqua salata. La fase acquosa viene eliminata, mentre quella organica, dopo disidratazione su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, viene concentrata a secco. Il prodotto ottenuto viene purificato per

cromatografia su colonna su 75 g di gel di silice, eluendo il composto desiderato con etere di petrolio/acetato d'etile 99:1. Si ottengono 0.9 g di dodecaidroiperforina avente le seguenti caratteristiche chimico fisiche e spettroscopiche:

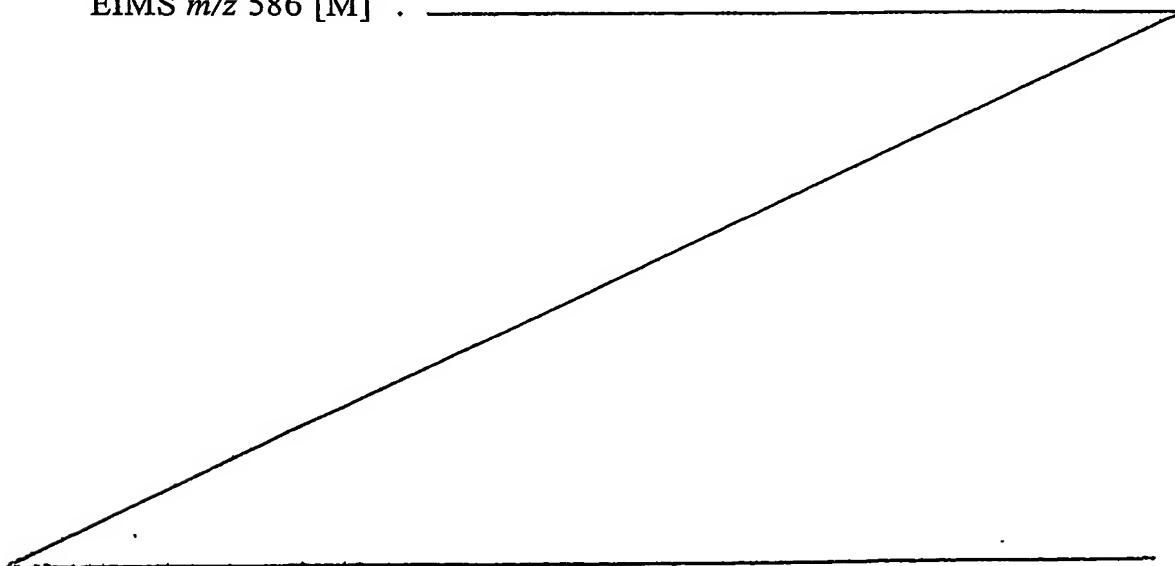
EIMS  $m/z$  548  $[M]^+$ .

**Esempio 5 - Preparazione di acetil-ottaidroiperforina.**

In un pallone a due colli si sciolgono 300 mg di acetiliperforina (P.M.=578; 0,52 mmol) in 3 ml di MeOH, dopodiché si aggiunge il catalizzatore (Pd 5% su carbone). La reazione viene controllata in TLC (etero di petrolio/EtOAc 95:5 R<sub>fp</sub>=0,43; R<sub>fa</sub>=0,52). Dopo quattro ore la reazione è ultimata. Il catalizzatore viene separato per filtrazione su un imbuto con filtro sinterizzato ricoperto da uno strato di celite, quindi si evapora il MeOH.

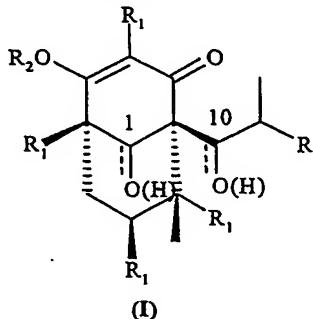
Il prodotto della reazione viene purificato per chromatografia su colonna di 30 g di gel di silice, eluendo il prodotto con una miscela di etere di petrolio/acetato d'etile 9:1. Si ottengono per cristallizzazione da metanolo 150 mg del composto desiderato avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

EIMS  $m/z$  586  $[M]^+$ .



## RIVENDICAZIONI

## 1. Derivati dell'iperforina e dell'adiperforina di formula (I)



in cui R rappresenta metile o etile, R2 rappresenta idrogeno, un catione di base inorganica o organica farmaceuticamente accettabili o un residuo acilico C2-C5, lineare o ramificato e in cui, alternativamente:

- a) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso;
- b) R1 rappresenta 3-metil-2-buten-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi;
- c) R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi idrossi

per uso come medicamento.

2. Derivati secondo la rivendicazione 1 per la preparazione di farmaci per uso nel trattamento della depressione del morbo di Alzheimer.
3. Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui R2 rappresenta idrogeno.
4. Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui R2 rappresenta litio, R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso.
5. Derivato secondo la rivendicazione 4 in cui R rappresenta metile.
6. Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui R2 rappresenta acetile,

R1 rappresenta 3-metil-but-1-il e in posizione 1 e 10 sono presenti gruppi osso.

7. Derivato secondo la rivendicazione 6 in cui R rappresenta metile.
8. Un composto scelto fra:  
dodecaidroiperforina (Ie), dodecaidroadiperforina (If),  
acetilottaidroiperforina (Ih) acetilottaidroadiperforina (Ii).
9. Composizioni farmaceutiche contenenti i composti della rivendicazione 4.

Milano, 23 aprile 2002

Il Mandatario  
(Bianchetti Giuseppe)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

*G. Bianchetti*

